

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2000 (16.05.00)	
International application No. PCT/CN99/00157	Applicant's or agent's file reference D9906002P
International filing date (day/month/year) 10 October 1999 (10.10.99)	Priority date (day/month/year) 19 October 1998 (19.10.98)
Applicant LIU, Jingye et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

26 April 2000 (26.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Juan Cruz Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PCT

世界知识产权组织
国际局

按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号: A61K 39/29, 9/19	A1	(11) 国际公布号: WO00/23104 (43) 国际公布日: 2000年4月27日(27.04.2000)
(21) 国际申请号: PCT/CN99/00157 (22) 国际申请日: 1999年10月10日(10.10.1999) (30) 优先权: 98120633 1998年10月19日(19.10.1998) CN (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 卫生部长春生物制品研究所(CHANGCHUN INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS MINISTRY OF PUBLIC HEALTH) [CN/CN]; 中国吉林省长春市西安大路137号, 邮政编码:130062, Jilin (CN). (72) 发明人; 及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 刘景晔(LIU, Jingye) [CN/CN]; 王鹏富(WANG, Pengfu) [CN/CN]; 李光谱(LI, Guangpu) [CN/CN]; 谢宝生(XIE, Baosheng) [CN/CN]; 宋宗明(SONG, Zongming) [CN/CN]; 李淑焱(LI, Shuyan) [CN/CN]; 刘晶(LIU, Jing) [CN/CN]; 于颖(YU, Ying) [CN/CN]; 张喜珍(ZHANG, Xizhen) [CN/CN]; 梁本(LIANG, Ben) [CN/CN]; 刘令九(LIU, Lingjiu) [CN/CN]; 王玮(WANG, Wei) [CN/CN]; 张玲(ZHANG, Ling) [CN/CN]; 薛勇(XUE, Yong) [CN/CN]; 李晶(LI, Jing) [CN/CN]; 李玉红(LI, Yuhong) [CN/CN]; 林辉(LIN, Hui) [CN/CN]; 万宗举(WAN, Zongju) [CN/CN]; 中国吉林省长春市西安大路137号, 邮政编码:130062, Jilin (CN).		(74) 代理人: 北京三友专利代理有限责任公司(BEIJING SANYOU PATENT AGENCY CO., LTD.); 中国北京市北三环中路40号, 邮政编码:100088, Beijing (CN). (81) 指定国: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) 本国际公布: 包括国际检索报告。
(54) Title: FREEZE-DRIED HEPATITIS A ATTENUATED LIVE VACCINE AND ITS STABILIZER		
(54) 发明名称: 冻干甲型肝炎减毒活疫苗及其保护剂		
(57) Abstract The invention relates to hepatitis A vaccine, specifically to freeze-dried hepatitis A attenuated live vaccine which can be stored at room temperature for a long time and its industrial large scale production method. The invention relates further to stabilizer for freeze-dried virus live vaccine and its application in the production of vaccine, especially its application in the production of freeze-dried hepatitis A attenuated live vaccine and related enterovirus attenuated live vaccine.		

0000783 060404

(57) 摘要

本发明涉及甲型肝炎疫苗，特别是涉及一种可在常温下长期保存的冷冻干燥形式的甲型肝炎减毒活疫苗及其工业化规模大批量生产制备的方法。本发明进一步涉及冷冻干燥活疫苗病毒的保护剂及其在生产冻干减毒活疫苗中的应用，特别是涉及生产冻干甲型肝炎减毒活疫苗及相关肠道减毒活疫苗病毒中的应用。

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下：

AE 阿拉伯联合酋长国	DK 丹麦	KP 朝鲜民主主义人民共和国	RO 罗马尼亚
AG 安提瓜和巴布亚	DM 多米尼加	KR 韩国	RU 俄罗斯联邦
AL 阿尔巴尼亚	DZ 阿尔及利亚	KZ 哈萨克斯坦	SD 苏丹
AM 亚美尼亚	EE 爱沙尼亚	LC 圣卢西亚	SE 瑞典
AT 奥地利	ES 西班牙	LI 列支敦士登	SG 新加坡
AU 澳大利亚	FI 芬兰	LK 斯里兰卡	SI 斯洛文尼亚
AZ 阿塞拜疆	FR 法国	LR 利比里亚	SK 斯洛伐克
BA 波斯尼亚-黑塞哥维那	GA 加蓬	LS 莱索托	SL 塞拉利昂
BB 巴巴多斯	GB 英国	LT 立陶宛	SN 塞内加尔
BE 比利时	GD 格拉纳达	LU 卢森堡	SZ 斯威士兰
BF 布基纳法索	GE 格鲁吉亚	LV 拉托维亚	TD 乍得
BG 保加利亚	GH 加纳	MA 摩洛哥	TG 多哥
BJ 贝宁	GM 冈比亚	MC 摩纳哥	TJ 塔吉克斯坦
BR 巴西	GN 几内亚	MD 摩尔多瓦共和国	TM 土库曼斯坦
BY 白俄罗斯	GR 希腊	MG 马达加斯加	TR 土耳其
CA 加拿大	GW 几内亚比绍	MK 前南斯拉夫马其顿共和国	TT 特立尼达和多巴哥
CF 中非共和国	HR 克罗地亚	ML 马里	TZ 坦桑尼亚
CG 刚果	HU 匈牙利	MN 蒙古	UA 乌克兰
CH 瑞士	ID 印度尼西亚	MR 毛里塔尼亚	UG 乌干达
CI 科特迪瓦	IE 爱尔兰	MW 马拉维	US 美国
CM 喀麦隆	IL 以色列	MX 墨西哥	UZ 乌兹别克斯坦
CN 中国	IN 印度	NE 尼日尔	VN 越南
CR 哥斯达黎加	IS 冰岛	NL 荷兰	YU 南斯拉夫
CU 古巴	IT 意大利	NO 挪威	ZA 南非
CY 塞浦路斯	JP 日本	NZ 新西兰	ZW 津巴布韦
CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	PL 波兰	
DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	PT 葡萄牙	

冻干甲型肝炎减毒活疫苗及其保护剂

技术领域

本发明涉及甲型肝炎疫苗，特别是涉及一种可在常温下长期保存的冷冻干燥形式的甲型肝炎减毒活疫苗及其工业化生产制备方法；本发明进一步涉及冻干活疫苗病毒保护剂及其在生产冻干减毒活疫苗中的应用，特别是涉及其在生产冻干甲型肝炎减毒活疫苗中的应用。

技术背景

甲型肝炎是一种由自然界广泛存在的甲型肝炎病毒（HAV）引起的全球性高发病率的急性传染病。由于甲型肝炎具有流行普遍而且蔓延迅速的特点，所以甲肝的流行和预防已成为一个严重的公共健康和防疫的社会问题。据统计，全世界约有 40 亿人口受到该疾病的威胁，即使在经济高度发达的美国，每年也约有 10,000 例以上的肝炎病人与甲型肝炎病毒感染有关。特别是在包括中国在内的发展中国家，由于人口众多，社会经济和公共卫生条件相对落后，所以常常在某些局部地区发生甲型肝炎的大规模暴发和流行，特别是在自然灾害之后。据粗略统计，在中国有近 4 亿人口受到甲型肝炎的威胁，每 10 万人口中约有 200 至 300 人遭受甲型肝炎疾病的侵害。因此，发展高特异性和安全性的甲肝减毒活疫苗是临床病毒学研究中的一个重要课题，自本世纪七十年代末以来，许多研究者致力于甲型肝炎灭活疫苗或减毒活疫苗的研究，不断有关于这一研究领域的成果和专利被公开。例如，美国专利 4,164,566 号公开了在亚人类灵长目的动物（如狨猴）细胞培养物中连续传代选育甲型肝炎病毒株，并以所得到的甲型肝炎病毒株 CR326F 株在多种细胞系内传代增殖，制备甲型肝炎疫苗的方法。

中国专利 ZL 92114998.0 号中详细描述了制备甲型肝炎减毒株 L-A-1 的方法, 以及以所说的甲型肝炎 L-A-1 减毒株为毒种, 工业化规模生产甲型肝炎减毒活疫苗的方法。简单地说, 该方法包括首先将人胚肺二倍体细胞按 1:2~1:4 的分种率, 使用加有 10~15% 新生牛血清的细胞培养液 (MEM) (pH 7.2~7.6) 扩增传代。将细胞培养瓶置于 37℃ 下旋转培养 5~8 天, 使之生长成致密的细胞单层, 然后弃去细胞生长液, 并以平衡盐溶液如 Earle 氏液反复冲洗细胞 3~5 次后接种按中国专利 ZL 92114998.0 实施例 1 中所述方法制备的疫苗病毒种子液, 并补加细胞培养维持液, 于 34~36℃ 下培养, 每周换液一次, 约 3 至 4 周后弃去维持液和残留的小牛血清, 直接加入含有或不含有酚红的 199 综合培养液, 继续培养 (34~36℃ 下) 4 至 6 天后, 收集细胞。经三次反复冻融后超声破碎细胞, 合并离心除去细胞碎片, 收集上清液即得到甲型肝炎减毒活疫苗原液。

另外, 也可按照中国专利 ZL 85107525 号中所述的方法制备用于本发明的甲型肝炎减毒活疫苗原液。

15 本发明进一步提供了可使冷冻干燥形式的活疫苗病毒长时间保持其生物学活性的冻干活疫苗病毒保护剂, 该保护剂基本上由人血清白蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸、选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸中的一种或两种及其碱金属盐、以及尿素、甘露醇和/或山梨醇、肌醇等组成; 其中所说的保护剂中各基本成分的含量分别为人血清白蛋白 0~20g/L、明
20 胶 5~10g/L、海藻糖 50~100g/L、谷氨酸钠 7.5~15g/L、抗坏血酸 0.5~5.5g/L、尿素 5~28g/L、山梨醇和/或甘露醇 2~10g/L 和肌醇 4~10g/L, 余量为水。

甲型肝炎病毒是一种不带有包膜, 也不含脂类的微小核糖核酸病毒。甲型肝炎病毒与大多数肠道病毒一样, 在以液态形式存在时, 如无有效保护剂, 常温下均很容易被失活, 失去其再生、增殖和对其敏感宿主细胞感
25 染的能力。但活疫苗一旦由于无有效保护剂或由于不适宜的运输或储存等

条件被失活，便难于达到所应具有的免疫保护能力。因此，研究并使用具有有效保护作用的活疫苗病毒保护剂，制备出可以在常温甚至更高温度下可长期保存的冻干减毒活疫苗，特别是冻干甲型肝炎减毒活疫苗是本发明的另一重要特征。

5 在如上文所述的活疫苗病毒保护剂中，人血清白蛋白和明胶主要起蛋白质和胶体支架作用，为悬液或冻干后的活病毒提供空间支持和部分营养保护作用。海藻糖具有稳定细胞和蛋白质结构、抵御高温破坏的功能。研究证明，在海藻糖存在下干燥处理后的许多抗体、酶、病毒等生物活性材料，当重新水合后均能恢复其活力 (Roser B., Food Sci & Technol.2(7):

10 166-169,1991; Roser B.,Biopharm.4(8): 47-53,1991; Roser B., Colace C., New Scientist,138: 24-28,1993), 利用海藻糖干燥处理小儿麻痹疫苗已获得了成功。谷氨酸等碱性氨基酸盐、尿素、甘露醇和/或山梨醇和肌醇、以及抗坏血酸等，在本发明的冻干保护剂中则主要起到调整 pH，稳定水合状态或脱水过程的渗透压，以及抗氧化等作用。

15 本发明的活疫苗病毒保护剂可以在适当的容器内，按常规试剂配制方法配制，但在混入海藻糖、明胶、山梨醇和/或甘露醇及肌醇之前，应将这些物质于 37℃下预加热 24~48 小时，并且在待冻干的疫苗分装前 0.5~2 小时内将保护剂与待冻干疫苗以大约 1:1 (v/v) 的比例混合均匀。用于冷冻干燥处理的甲型肝炎减毒活疫苗原液是按常规方法 (如按中国专利 ZL 20 92114998.0 所述的方法) 制备的，可使用常规冷冻干燥装置将已分装好的上述疫苗组合物于 -20℃~-50℃下预冷冻 3~6 小时，然后于 -38℃至 35℃下真空干燥 10~20 小时，冻干过程中，其共熔点温度应低于 -30℃。

为了证实本发明提供的活疫苗病毒保护剂的保护作用，以甲型肝炎减毒活疫苗为例，在加入和不加入本发明冻干保护剂条件下，对其冻干前和
25 冻干后的病毒 (活性) 滴度，以及冻干保护剂对疫苗病毒之储存稳定的影

响进行了一系列的比较试验。试验结果显示, 本发明的活疫苗病毒保护剂不仅在其冷冻干燥处理过程中对甲肝病毒的活性具有极好的保护作用, 而且在冻干后的长期放置中, 可以显著地提高甲型肝炎减毒活疫苗在 2-8℃、常温和较高温度下 (37℃) 的保存稳定性。

在此基础上, 发明人还以同样方法检测了本发明的冻干保护剂对麻疹减毒活疫苗以及甲肝-麻疹联合疫苗病毒活性的保护效果, 进行了同样的冻干前后病毒 (活性) 滴度比较试验和冻干制品在不同温度与贮存时间条件下的贮存稳定性试验。试验结果显示, 本发明的活疫苗病毒保护剂同样可以有效地保护麻疹减毒活疫苗及甲肝-麻疹联合疫苗在其冷冻干燥处理过程中的病毒活性, 以及这些疫苗病毒在 2~8℃、常温 (25℃) 以及更高温度下 (37℃) 的保存稳定性。

我们的试验还发现, 当本发明所提供的冻干保护剂用于甲型肝炎减毒活疫苗、麻疹减毒活疫苗及甲型肝炎-麻疹联合疫苗时, 在如前所述的冻干保护剂中加入极少量或完全不加入人血清白蛋白, 如适当调整冻干曲线, 同样可以实现良好的冻干保护效果。

本发明的实施方案

实施例 1 冻干活疫苗病毒保护剂 (I) 的制备

按下列配方配制含有人血清白蛋白的冻干活疫苗病毒保护剂 (I):

成 分	含 量(g/L)
人血清白蛋白	10.0
明胶	5.5
海藻糖	65.0
谷氨酸钠	10.0
尿素	20.0

抗坏血酸	5.5
山梨醇	6.5
肌醇	7.5

首先将医用明胶 5.5g 溶解于大约 300ml 蒸馏水中, 加热煮沸使之溶解, 于大约 116℃ 下高压蒸汽灭菌 40 分钟后室温冷却至 30~35℃, 然后向该明胶溶液中加入 10.0g 使用滤膜或滤柱 (0.1、0.2、0.5、1.0 μm) 连续过滤除菌所获得的人血清白蛋白, 并充分搅拌混匀后备用。

按上述配方称取海藻糖、尿素、抗坏血酸、山梨醇和肌醇, 并依次加入到大约 500ml 蒸馏水中, 在振荡搅拌均匀后将混合物于 37℃ 预加热约 24 小时, 冷却至室温 (22~26℃) 后将所得混合物溶液与上述的明胶-人血清白蛋白溶液混合均匀, 以蒸馏水补足体积至 1L, 并用 0.1N HCl 调至 pH7.0, 再次过滤除菌后即得到本发明的冻干活疫苗病毒保护剂 (I)。

实施例 2 冻干活疫苗病毒保护剂 (II) 的制备

按下述配方, 基本上按照实施例 1 所述的方法配制冻干活疫苗病毒保

15 护剂 (II):

<u>成 分</u>	<u>含 量 (g/L)</u>
明胶	8.5
海藻糖	75.0
尿素	15.5
20 L-精氨酸 (或 L-精氨酸钠)	10.1
抗坏血酸	3.0
山梨醇	5.0
甘露醇	5.0
肌醇	4.0

25 与保护剂 (I) 不同的是, 本实施例制备的冻干保护剂 (II) 不含有价

格较昂贵并且有可能导致肝炎甚或 HIV 病毒污染的人血清白蛋白，并且其中以 L-精氨酸或其钠盐代替保护剂 (I) 中的谷氨酸钠。另外，该保护剂 (II) 中添加了少量的可以进一步提高保护效果的甘露醇。

实施例 3 冻干甲型肝炎减毒活疫苗的制备

5 按照中国专利 ZL 92114998.0 号所述方法制备甲型肝炎减毒活疫苗原液。简单地说，首先用申请人所建立的甲型肝炎 L-A-1 病毒株感染按适当分种率传代增殖的人胚肺二倍体细胞，并且于 35℃ 培养条件下连续培养 4 周，每周换液一次。约 3 周时以间接免疫荧光法 (IF) 检测被感染细胞的阳性率，如达 90% 以上时弃去维持液及残留的新生牛血清，并加入含低浓度盐但不含酚红的 199 综合培养液，继续培养 4~6 天后收集细胞。经三次反复冻融并超声破碎细胞后，离心除去细胞碎片，收集上清液即得到悬液形式的甲型肝炎减毒活疫苗原液。

按照实施例 1 中所述方法制备的保护剂 (I) 以 1:1 (v/v) 的比例加入到上述甲肝减毒活疫苗原液中，混匀后无菌分装并置于密闭的真空冷冻干燥器 (FS150-SS20C 型, Hu11 Co., USA) 内进行冻干处理，首先将疫苗组合物于大约 -40℃ 下预冷冻 4 小时，然后逐渐升温，在 -38℃ 至 32℃ 条件下真空干燥约 15 小时即得到所需的冻干甲型肝炎减毒活疫苗。

实施例 4 冻干麻疹减毒活疫苗的制备

按照现行的中国生物制品规程中《麻疹减毒活疫苗制造与检定规程》的要求制备原液形式的麻疹减毒活疫苗。将该疫苗原液与按实施例 2 中所述方法制备的活疫苗病毒保护剂 (II) 以 1:1 (v/v) 的比例混合，将此疫苗组合物于大约 -40℃ 预冷冻 5 小时，然后于约 -35℃ 至 34℃ 下真空干燥约 14 小时，得到所需的冻干麻疹减毒活疫苗。

实施例 5 冻干甲型肝炎减毒活疫苗的稳定性的

首先用无菌水对按实施例 3 所述方法制备的多批冻干甲型肝炎减毒活疫苗进行 10 倍系列稀释, 然后取 10^{-2-7} 稀释度稀释的病毒液进行病毒滴定, 并以不加本发明所提供的冻干保护剂的具有同样干前滴度的同一批疫苗原液, 在相同条件下冷冻干燥之, 以此冻干样品作为对照。两组疫苗样品同时进行病毒滴定, 35℃培养 28 天后收集培养物并经超声、离心等后处理, 以酶联免疫吸附法 (ELISA) 和间接免疫荧光 (IF) 法检测甲型肝炎病毒滴度。结果显示, 加入本发明冻干保护剂冷冻干燥的样品, 冻干后 5 份实验组样品的感染滴度为 6.33 至 6.50, 而不加本发明冻干保护剂冷冻干燥的样品, 冻干后 5 份对照组样品的感染滴度则下降到 1.33 至 2.33。

10 在另一项试验中, 则观察到在加入本发明保护剂的情况下, 5 批疫苗样品, 在冻干前和冻干后的病毒感染性滴度下降值均 $\leq 0.5 \text{LogCCID}_{50}/\text{ml}$ 。

在此基础上, 本实施例进一步按上述相同的方法试验了在有保护剂存在时, 冻干甲型肝炎减毒活疫苗于 2~8℃温度下, 分别保存 3 至 12 个月的稳定性, 并比较了甲型肝炎减毒活疫苗液体制剂和冻干制剂在 2~8℃、室
15 温及 37℃条件下保存不同时间的稳定性比较, 结果分别见表 1 和表 2 所示。

表 1 加保护剂冻干的甲肝减毒活疫苗于 2~8℃的稳定性

样品批号	时间 (月)				
	0	3	6	9	12
1	6.50	6.67	6.67	6.50	6.50
2	6.67	6.50	6.67	6.50	6.67
3	6.50	6.50	6.33	6.50	6.50
4	6.50	6.67	6.67	6.50	6.33
5	6.33	6.50	6.50	6.50	6.33

说明: 表中不同保存时间 (月数) 后检测的病毒感染性滴度 ($\text{LogCCID}_{50}/\text{ml}$)。

表 2 甲型肝炎减毒活疫苗液体剂型和冻干剂型的稳定性比较*

保存温度	有 效 期	
	液体剂型	冻干剂型
2~8℃	3 个月	12 个月
室温 (25℃)	7 天	3 个月
37℃	1 天	7 天

* 所给数据为 5 批样品的最低保存期限

从上列表 1 和表 2 所示的结果可以看出, 本发明的活疫苗病毒保护剂具有在干燥、高温和渗透压条件下稳定病毒蛋白质及核酸结构, 有效地维持疫苗病毒的活力, 并显著延长其有效期的作用。

实施例 6 冻干甲型肝炎减毒活疫苗的免疫原性和安全性试验

以每 5 只血清抗 HAV 阴性, 血清谷丙转氨酶 (SGPT) 水平正常的健康恒河猴 (平均体重 4.5Kg) 为实验对象, 以接种按实施例 3 所述方法制备并于室温下贮存 1 个月的冻干甲型肝炎减毒活疫苗为实验组, 并以未经冻干处理也不加冻干保护剂的同样病毒滴度的甲型肝炎减毒活疫苗液体剂型作为对照。分别给实验组 (1-3 组) 动物静脉接种冻干疫苗样品 1.0ml, 第 4 组 (对照组) 动物则静脉接种同样剂量的对照 (液体) 疫苗样品。接种后 0、2、4、6 和 8 周采集动物静脉血液, 检测动物血清 SGPT 值和抗 HAV 抗体滴度, 同时, 对各组动物进行肝组织穿刺并进行活体组织病理学检查。结果如下列表 3 所示。

表 3 冻干甲型肝炎减毒活疫苗接种猴体前、后血清 SGPT 和抗 HAV 检测结果

疫苗批号	SGPT*异常升高				抗 HAV 抗体阳性率**%				抗 HAV IgM 阳性率**%			
	0	2	4	8(W)	0	2	4	8(W)	0	2	4	8(W)
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0	60	100	100	0	60	40	0
2	0/5	0/5	0/5	0/5	0	40	100	100	0	80	40	0
3	0/5	0/5	0/5	0/5	0	60	80	100	0	60	40	20
对照样品	0/5	0/5	0/5	0/5	0	60	60	100	0	80	20	0

*采用赖氏法检测 SGPT, 结果 $>25\text{U/ml}$ 为转氨酶异常升高;

**所给数值为各组 5 只动物的阳转率。

- 5 从表 3 所示结果可以看出, 本发明的冻干甲型肝炎减毒活疫苗在经过冷冻干燥处理并于室温 (25°C) 下贮存 30 天后, 仍保留其初始状态下的免疫原性和使用安全性。冻干过程和室温贮存 30 天期间基本上没有导致疫苗生物学功能的丢失, 具有同样良好的使用安全性及免疫原性。

实施例 7 冻干麻疹减毒活疫苗的保存稳定性

- 10 基本上按照实施例 5 中所述方法检测冻干麻疹减毒活疫苗在冻干前和冻干后病毒感染性滴度的改变, 以及冻干后的麻疹活疫苗分别在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 和 37°C 温度下的保存稳定性。

结果显示, 使用本发明的活疫苗病毒冻干保护剂冷冻干燥麻疹减毒活疫苗, 冻干处理过的 5 批疫苗样品的滴度下降幅度均 $\leq 0.5\text{Log CCID}_{50}/\text{ml}$ 。

- 15 冻干麻疹减毒活疫苗在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存 15 个月病毒滴度降低 $< 0.5\text{Log CCID}_{50}/\text{ml}$, 37°C 温度下保存 4 周病毒滴度下降 $< 1.0\text{Log CCID}_{50}/\text{ml}$ 。

权利要求

1、一种冻干甲型肝炎减毒活疫苗，其特征在于由含有有效预防剂量的甲型肝炎减毒活疫苗原液和活疫苗病毒保护剂组成。

2、根据权利要求1所述的冻干甲型肝炎减毒活疫苗，其中所说的甲型肝炎减毒活疫苗原液是按已知方法制备的。

3、根据权利要求1所述的冻干甲型肝炎减毒活疫苗，其中所说的活疫苗病毒保护剂基本上由人血清白蛋白和/或明胶、海藻糖、选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸中的一种或两种氨基酸或其碱金属盐，以及抗坏血酸、尿素、甘露醇和/或山梨醇和肌醇组成。

4、根据权利要求3所述的冻干甲型肝炎减毒活疫苗，其中所说的氨基酸碱金属盐包括谷氨酸钠。

5、根据权利要求3或4所述的冻干甲型肝炎减毒活疫苗，其中所说的活疫苗病毒冻干保护剂中各主要成分的含量分别为人血清白蛋白0~20g/L、明胶5~10g/L、海藻糖50~100g/L、谷氨酸钠7.5~15g/L、抗坏血酸0.5~5.5g/L、尿素5~28g/L、甘露醇和/或山梨醇2~10g/L、肌醇4~10g/L及余量水。

6、根据权利要求3所述的冻干甲型肝炎减毒活疫苗，其中所说的活疫苗病毒冻干保护剂也可以不含有血清白蛋白。

7、制备如权利要求1至6中任何一项所限定的冻干甲型肝炎减毒活疫苗的方法，该方法包括：

(1) 制备甲型肝炎减毒活疫苗原液；

(2) 在步骤(1)所述的病毒疫苗原液中，按1:1(v/v)的比例加入活疫苗病毒保护剂，该保护剂由人血清白蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸、选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱金属盐、尿素、甘露醇和/或山梨醇和肌醇组成，并混匀之得到疫苗组合物；

(3) 冷冻干燥由步骤(2)得到的疫苗组合物。

8、根据权利要求7的制备方法，其中步骤(3)所说的冷冻干燥步骤包括首先将所说的疫苗组合物于大约-20℃~50℃的温度下预冷冻 3~6 小时，然后真空干燥 10~20 小时，干燥温度的范围为-38~35℃。

9、一种减毒活疫苗病毒冻干保护剂，该保护剂基本上由人血清白蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸，选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸中的一种或二种氨基酸或其碱金属盐、尿素以及甘露醇和/或山梨醇和肌醇组成。

10、根据权力要求9的减毒活疫苗病毒冻干保护剂，其中各组成成份的含量分别为：人血清白蛋白 0~20g/L、明胶 5~10 g/L、海藻糖 50~100 g/L、谷氨酸钠 7.5~15 g/L、抗坏血酸 0.5~5.5 g/L、尿素 5~28 g/L、山梨醇和/或甘露醇 2~10 g/L 和肌醇 4~10 g/L，余量为水。

11、根据权利要求9所述的减毒活疫苗病毒冻干保护剂，其适用范围也包括肠道病毒、副粘病毒、虫媒病毒或疱疹病毒等的活疫苗病毒的冻干保护。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN99/00157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷: A61K39/29, A61K9/19

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

A61K, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

CNPAT, Chinese Scientific and Technical Journals

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ (hepatitis, lyophilize, stabilize, protect)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
Y	WO/A,9828000 (MERCK & CO INC) 02 JUL 1998 See the whole document	1-4, 6-9, 11
Y	JP 1279843 (CHIBA-KEN et al) 10 NOV 1989 See the whole document	1-4, 6-9, 11
A	CN 1191490 (GENETECH INC) 26 AUG 1998 See the whole document	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 January 2000 (03.01.2000)

Date of mailing of the international search report

20 January 2000 (20.01.00)

Name and mailing address of the ISA/

The State Intellectual Property Office Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

ZHOU LI

Telephone No. 86-10-62093933

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN99/00157

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A-9828000	02-07-1998	AU-A-6013798	17-07-1998
		ZA-A-9711436	25-11-1998
CN-A-1191490	26-08-1998	WO-A- 9704801	13-02-1997
		AU-A- 6599296	26-02-1997
		ZA-A- 9606075	25-03-1998
		NO-A- 9800335	26-03-1998
		EP-A- 0845997	10-06-1998
		BR-A-9609743	02-03-1999

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 99/00157

A. 主题的分类

IPC⁷:A61K39/29, A61K9/19

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

A61K, C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CNPAT, 中文科技期刊光盘

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPODOC, PAJ (hepatitis, lyophilize, stabilize, protect)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
Y	WO,A,9828000 (MERCK & CO INC) 02. 07. 98 全文	1-4, 6-9, 11
Y	JP 1279843 (CHIBA-KEN et al) 10. 11. 89 全文	1-4, 6-9, 11
A	CN 1191490 (GENETECH INC) 26. 08. 98 全文	1-11

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

"A" 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

"E" 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

"L" 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

"P" 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

"T" 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件: 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

"Y" 特别相关的文件: 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

03. 01 月 2000 (03.01.2000)

国际检索报告邮寄日期

20. 1月 2000 (20.01.00)

国际检索单位名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-10-62019451

受权官员

周莉

电话号码: 86-10-62093933

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN99/00157

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO-A-9828000	02-07-1998	AU-A-6013798 ZA-A-9711436	17-07-1998 25-11-1998
CN-A-1191490	26-08-1998	WO-A- 9704801 AU-A- 6599296 ZA-A- 9606075 NO-A- 9800335 EP-A- 0845997 BR-A-9609743	13-02-1997 26-02-1997 25-03-1998 26-03-1998 10-06-1998 02-03-1999

Claims

What is claimed is:

1. A stabilized lyophilized hepatitis A live vaccine formulation comprising a prophylactically effective titers of live attenuated hepatitis A virus and a stabilizer, wherein said stabilizer is present in the vaccine formulation at a concentration sufficient to stabilize the hepatitis A virus against heat inactivation.

2. A stabilized lyophilized hepatitis A vaccine formulation according to claim 1, wherein said live attenuated hepatitis A virus is prepared from the wild-type HAV, strain L-A-I.

3. A stabilized lyophilized hepatitis A live vaccine formulation according to claim 1, wherein said stabilizer for lyophilized live hepatitis A virus comprises human serum albumin or gelatin or both of them, trehalose, at least one amino acid selected from the group consisting of glutamic acid, aspartic acid, arginine, lysine or alkali metal salts thereof, ascorbic acid, urea, mannitol or sorbitol or both of them, and inositol.

4. A stabilized lyophilized hepatitis A live vaccine formulation according to claim 1, wherein said stabilizer for lyophilized live virus may optionally contain human serum albumin.

5. A stabilized lyophilized hepatitis A live vaccine formulation according to either one of claim 3 or 4, wherein said stabilizer for the lyophilized live virus comprises from 0 to 20 grams per liter of human serum albumin, from 5 to 10 grams per liter of gelatin, from 50 to 100 grams per liter of trehalose, from 7.5 to 15 grams per liter of sodium glutamate, from 0.5 to 5.5 grams per liter of ascorbic acid, from 5 to 28 grams per liter of urea, from 2 to 10 grams per liter of mannitol or sorbitol, from 4 to 10 grams per liter of inositol.

6. A method of preparing stabilized lyophilized liver hepatitis A vaccine formulation according to any one of the claims 1 to 5, comprising:

- (a) providing a stock suspension of attenuated liver Hepatitis A virus,
- (b) adding a stabilizer solution to stock suspension of attenuated live hepatitis A virus obtained from step (a) at the ratio 1:1 (v/v) to obtain a live vaccine formulation comprising prophylactically effective titers of live attenuated hepatitis A virus and a stabilizer for attenuated live virus, wherein said stabilizer comprises gelatine, thehalose, one or two amino acid selected from the group consisting of glutamic acid, aspartic acid, arginine, lysine or alkali metal salts thereof, ascorbic acid, urea, mannitol or sorbitol or a mixture of them, and inositol.
- (c) lyophilizing said vaccine formulation obtained from the step (b).

7. A stabilizer for lyophilized live virus, wherein said stabilizer comprises gelatin, trehalose, at least one amino acid selected from the group consisting of glutamic acid, aspartic acid, arginine, lysine or alkali metal salts thereof, ascorbic acid, urea, mannitol or sorbitol or a mixture of them, and inositol.

8. A stabilizer according to claim 7, wherein said stabilizer comprises from 0 to 20 grams per liter of human serum albumin, from 5 to 10 grams per liter of gelatin, from 50 to 100 grams per liter of trehalose, from 7.5 to 15 grams per liter of sodium glutamate, from 0.5 to 5.5 grams per liter of ascorbic acid, from 5 to 28 grams per liter of urea, from 2 to 10 grams per liter of mannitol or sorbitol, and from 4 to 10 grams per liter of inositol.

9. A stabilizer according to claim 7, wherein said stabilizer for lyophilized live virus

vaccine further comprises human serum albumin.

10. A stabilizer according to claim 7, wherein saidvirus is selected from the group consisting of Enterovirus, Pavamyxovirus, Arbovirus, and Herpesvirus.

ABSTRACT

[00055]The present invention relates to hepatitis A vaccine, especially to a lyophilized attenuated hepatitis A vaccine which can be stored at ambient temperature for extended periods of time, and to a method for producing the same. The present invention further relates to a stabilizer for lyophilized live vaccine and its use in improving thermostability of lyophilized live vaccine during lyophilization processing and storage period after lyophilization.

REC'D 15 FEB 2001

WIPO PCT

Applicant's or agent's file reference D9906002P		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CN99/00157	International filing date (day/month/year) 10 OCT 1999(10.10.99)	Priority date (day/month/year) 19 OCT 1998(19.10.98)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int.Cl ⁷ : A61K39/29, 9/19			
Applicant CHANGCHUN INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS MINISTRY OF PUBLIC HEALTH ET AL.			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and /or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty ,inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2)with regard to novelty ,inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application.</p>			
Date of submission of the demand 26 APR 2000(26.04.00)		Date of completion of this report 18 JAN 2001(18.01.01)	
Name and mailing address of the IPEA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer HUANG CHI Telephone No. 62093906	



I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:**☒ the international application as originally filed☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

Nos _____, as originally filed

Nos _____, as amended (together with any statement) under Article 19

Nos _____, filed with the demand

Nos _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

sheets/fig _____, as originally filed

sheets/fig _____, filed with the demand

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. with regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).**3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:☐ contained in the international application in written form.☐ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.**4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:**☐ the description, pages _____☐ the claims No. _____☐ the drawings, sheets/fig _____**5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).****

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty(N)	Claims <u>1-11</u>	YES
	Claims _____	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>1-1</u>	YES
	Claims _____	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-11</u>	YES
	Claims _____	NO

2. Citation and explanations

Claims 1 — 11 refer to lyophilized hepatitis A attenuated live vaccines, a process of preparing said vaccines and a stabilizer for said vaccines.

There are three documents cited in the international research report:

WO9828000. The document disclosed vaccine formulations, lyophilized vaccines and vaccine stabilizers.

JP1279843. The document disclosed lyophilized vaccines.

CN1191490. The document disclosed stabilized and lyophilized protein formulations.

The technical features of Claims 1 — 11 are not found in the prior art, and they are not obvious to the skilled in the art, so, the claims 1-11 are novelty and have inventive step. Additionally, claims 1-11 could apply in industry, so they have industrial applicability.

专 利 合 作 条 约

PCT

国际初步审查报告
(PCT 条约 36 和细则 70)


REC'D 15 FEB 2001

WIPO

PCT

申请人或代理人的档案号 D9906002P	关于后续行为 参见“传送国际初步审查报告的通知”(PCT/IPEA/416 表)	
国际申请号 PCT/CN99/00157	国际申请日(日/月/年) 10.10 月 1999(10.10.99)	优先权日(日/月/年) 19.10 月 1998(19.10.98)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类 Int.Cl ⁷ : A61K39/29, 9/19		
申请人 卫生部长春生物制品研究所 等		

1. 本国际初步审查单位已作出国际初步审查报告并依照条约第 36 条将其传送给申请人。 2. 本报告共计 3 页, 包括扉页。 <input type="checkbox"/> 本报告还有附件, 即修改后的并且作为本报告基础的说明书修改页、权利要求书修改页和/或附图修改页, 和/或对本国际初步审查单位所作出的更正页(见 PCT 细则 70.16 和行政规程 607)。 这些附件共计 _____ 页
3. 本报告包括关于下列各项的内容: I <input checked="" type="checkbox"/> 报告的基础 II <input type="checkbox"/> 优先权 III <input type="checkbox"/> 不作出关于新颖性、创造性和工业实用性的意见 IV <input type="checkbox"/> 缺乏发明的单一性 V <input checked="" type="checkbox"/> 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见; 支持这种意见的引证和解释 VI <input type="checkbox"/> 引用的某些文件 VII <input type="checkbox"/> 国际申请中的某些缺陷 VIII <input type="checkbox"/> 对国际申请的某些意见

提交要求书的日期 26.4 月 2000(26.04.00)	完成本报告的日期 18.1 月 2001(18.01.01)
国际初步审查单位名称和地址 IPEA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-10-62019451	受权官员 黄 赤 电话号码: 62093906 

国际初步审查报告

国际申请号

PCT/CN99/00157

I. 报告的基础

1. 关于国际申请中各个部分: *

☒ 原始提交的国际申请。

☐ 说明书, 第 _____ 页, 按原始提交的,
第 _____ 页, 随要求书提交的,
第 _____ 页, _____ 的信件提交的。

☐ 权利要求, 第 _____ 页, 按原始提交的,
第 _____ 页, 按条约第 19 条修改的(附有说明),
第 _____ 页, 随要求书提交的。
第 _____ 页, _____ 的信件提交的。

☐ 附图, 第 _____ 页, 原始提交的。
第 _____ 页, 随要求书提交的,
第 _____ 页, _____ 的信件提交的。

☐ 说明书中的序列表部分
第 _____ 页, 原始要求提交的,
第 _____ 页, 随要求书提交的,
第 _____ 页, _____ 的信件提交的。

2. 关于所使用的语言, 除本项下另有说明外, 本国际初步审查单位所获得的或者已向本国际初步审查单位提交的上述所有部分, 所使用的语言均为提交本国际申请时所使用的语言。

本国际初步审查单位所获得的或向本国际初步审查单位提交的这些部分所使用的语言是 _____, 这种语言是

- ☐ 为了国际检索而提交的译本所使用的语言(细则 23.1 (b))。
- ☐ 本国际申请公布时所使用的语言(细则 48.3 (b))。
- ☐ 为了国际初步审查而提交的译本所使用的语言(细则 55.2 和/或 55.3)。

3. 关于本国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸的序列, 本国际初步审查是根据下面的序列表进行的:

- ☐ 国际申请中所包含的书写形式的序列表。
- ☐ 与国际申请同时提交的计算机可读形式的序列表。
- ☐ 后来以书写形式向本国际初步审查单位提交的序列表。
- ☐ 后来以计算机可读的形式向本国际初步审查单位提交的序列表。
- ☐ 已提交了关于后来提交的书写形式的序列表没有超出原始提交的国际申请所公开的范围的说明。
- ☐ 已提交了关于以计算机可读的形式记载的信息是与书写形式的序列表相同的说明。

4. 修改删除了以下内容的:

- ☐ 说明书, 第 _____ 页
- ☐ 权利要求, 第 _____ 项
- ☐ 附图, 第 _____ 页, 图 _____

5. ☐ 由于(某些)修改被认为超出了原始公开的范围, 如补充栏所示, 因此本报告是按照如同没有修改的情况作出的(细则 70.2(c)). **

* 按照条约第 14 条答复通知时向受理局提交的替换页, 在本报告中被称为“原始提交的”, 这些替换页不作为本报告的附件, 因为它们没有包含修改(细则 70.16 和 70.17)。

** 任何包含这种修改的替换页, 都必须在第 1 项中指明, 并作为本报告的附件。

V. 按条约 35 条(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的说明：支持这种声明的引证和解释

1. 声明

新颖性(N)	权利要求_____1—11_____有
	权利要求_____无
创造性(IS)	权利要求_____1—11_____有
	权利要求_____无
工业实用性(IA)	权利要求_____1—11_____有
	权利要求_____无

2. 引证和解释

权利要求 1—11 涉及冻干甲型肝炎减毒活疫苗，其制备方法和减毒活疫苗病毒冻干保护剂。

国际检索报告中引用了下面三篇对比文献：

W09828000。该对比文献公开了疫苗制剂、冻干疫苗以及用于冻干疫苗的保护剂。

JP1279843。该对比文献公开了一种冻干疫苗。

CN1191490。该对比文献公开了一种稳定的冻干蛋白质制剂。

权利要求 1—11 要求保护的技术特征在现有技术中没有被检索到，且它们相对于检索到的现有技术是非显而易见的，因此，权利要求 1—11 具有新颖性和创造性。另外，权利要求 1-11 均可以在工业上应用，故它们也具备工业实用性。